Anyplex^{TM}

Manual de Usuario

Anyplex^{TM} II
RV16 Detection (V1.1)



CE

Anyplex™ II RV16 Detection

Sistema de PCR Anyplex™ II para la detección de virus de influenza A, virus de influenza B, virus sincitial respiratorio A, virus sincitial respiratorio B, adenovirus, metapneumovirus, coronavirus 229E, coronavirus NL63, coronavirus OC43, parainfluenza virus 1, parainfluenza virus 2, parainfluenza virus 3, parainfluenza virus 4, rinovirus A/B/C, enterovirus y bocavirus 1/2/3/4 a partir de muestras de aspirados nasofaríngeos, hisopados nasofaríngeos y lavado bronquio-alveolar.

Para su uso con el

1. **Sistema de PCR en Tiempo real CFX-96™ (Bio-Rad)**

CE

IVD **(Uso para Diagnostico In Vitro)**

TABLA DE CONTENIDOS

NOTIFICACIONES

- Este producto se puede utilizar con propósitos de diagnóstico *in vitro* (IVD, *In Vitro Diagnostics*) en UE dado que la marca IVD CE está aprobada por la Directiva UE (98/79/EC).
- Los tipos de muestras aplicables son: **aspirados nasofaríngeos, hisopados nasofaríngeos y lavado bronquio-alveolar**. Esta prueba no se ha validado para otro tipo de muestras.
- **Almacene las muestras de ADN/ARN a -70° C hasta su uso y manténgalas en hielo durante el tiempo que sean utilizadas.**
- La sensibilidad del ensayo puede disminuir en muestras que son repetidamente congeladas y descongeladas o almacenadas por largos periodos de tiempo.
- La confiabilidad de los resultados depende de la recolección adecuada de la muestra, el transporte, almacenamiento y procesamiento.
- El flujo de trabajo en el laboratorio debe procesarse en una manera unidireccional.
- Siempre use guantes desechables en cada área y cámbielos antes de ingresar a las diferentes áreas. Cambie los guantes inmediatamente si se contaminan o trátelos con reactivo DNA decontaminante.
- Dedicar suministros y equipo a las áreas de trabajo separadas y no moverlos de un área a otra.
- No pipetee con la boca.
- No coma, beba o fume en las áreas de trabajo del laboratorio. Use guantes desechables libres de polvo, bata de laboratorio y gafas protectoras cuando manipule muestras y reactivos. Lave las manos después de manipular muestras y los reactivos de la prueba.
- Evite contaminar los reactivos al extraer alícuotas de los tubos de reactivos. Se recomienda el uso de puntas para pipetas estériles, desechables y con filtro resistente a aerosoles.
- No mezcle los reactivos de diferentes lotes o de tubos diferentes del mismo lote.
- No use este producto después de la fecha de vencimiento.
- Use tubos de tapa rosca y evite las salpicaduras o contaminación cruzada de muestras durante la preparación.
- Se cuidadoso para no contaminar los reactivos con ácidos nucleicos extraidos, productos de la PCR, y control positivo. Para prevenir la contaminación delos reactivos, se recomienda usar puntas con filtro.
- Use áreas separadas para cada experimento.
- Use un set diferente de pipetas para cada área: extracción de ADN, mezcla de reactivos, la adición de ácido nucleico de molde y la adición del producto de PCR.
- Solo en un espacio designado, abra los tubos de reacción o tiras después de la amplificación, para evitar la contaminación con amplicones.
- Almacene el material positivo aparte de los reactivos del kit.

- Los procedimientos de seguridad en el laboratorio se deben tener en cuenta para manipular las muestras.
- Limpie y desinfecte a fondo todas la superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0.5% (en agua desionizada o destilada)

USO PREVISTO

La prueba RV16 Detection de Anyplex™ II (V1.1) es un ensayo cualitativo *in vitro* para la detección de virus respiratorios en muestras de aspirados nasofaríngeos, hisopados nasofaríngeos y lavados bronquio-alveolares de pacientes sintomáticos.
La prueba Anyplex II RV16 (V1.1) consiste en dos reacciones de PCR (set A y set B).

El **Set A** es un ensayo multiplex que permite la amplificación simultánea del ácido nucléico objeto de 8 virus respiratorios.

El **Set B** es un ensayo multiplex que permite la amplificación simultánea del ácido nucleico objetivo de 8 virus respiratorios.

Set A	Set B
Influenza A (Flu A)	Virus sincitial respiratorio A (RSV A)
Influenza B (Flu B)	Virus sincitial respiratorio B (RSV B)
Adenovirus humano (Adv)	Metapneumovirus (MPV)
Parainfluenza 1 (PIV1)	Coronavirus 229E (229E)
Parainfluenza 2 (PIV2)	Coronavirus NL63 (NL63)
Parainfluenza 3 (PIV3)	Coronavirus OC43 (OC43)
Parainfluenza 4 (PIV4)	Bocavirus 1/2/3/4 (HBoV)
Rinovirus A/B/C (HRV A/B/C)	Enterovirus (HEV)

Flu A: Los *primers* detectan todos los subtipos del virus de influenza A, incluyendo el subtipo H5N1, el cual ocasiona gripa aviar altamente contagiosa y el nuevo subtipo de influenza A (H1N1) de origen porcino que fue detectado por primera vez en abril del 2009.

AdV: Los *primers* están diseñados para detectar la mayoría de los tipos B, C y E y algunos tipos de A, D Y F de adenovirus humanos.

HEV: los primers están diseñados para detectar todos los tipos A, B y algunos C, D de Enterovirus humanos.

PRINCIPIOS Y DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCEDIMIENTO

1. Principios

La prueba de detección RV16 de Anyplex™ II es representativa de la tecnología de Seegene y está basada en la nueva tecnología TOCE™, la cual permite detectar múltiples patógenos en un solo canal de fluorescencia en los instrumentos para PCR en tiempo real. En los ensayos de curvas de disociación actuales, se observan con frecuencia diferencias de temperatura entre los ADN que muestran una gran variación en sus

secuencias, lo que resulta problemático en el área de diagnóstico clínico, donde es crítica la exactitud y reproducibilidad de las pruebas. No obstante, la tecnología TOCE^{TM} está diseñada para no verse afectada por variaciones en la secuencia, por lo tanto, garantiza valores de Tm consistentes.

La prueba RV16 Detection de Anyplex^{TM} II representa una nueva clase de pruebas moleculares por multiplexado. El método de CMTA-cíclico puede discriminar mayor patógenos en muestras co-infectadas. Es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real que permite la amplificación, detección y diferenciación simultánea del material genético de virus de influenza A (Flu A), virus de influenza B (Flu B), virus sincitial respiratorio A (respiratory syncitial virus A, RSV A) virus sincitial respiratorio B (RSV B), adenovirus (AdV), metapneumovirus (MPV), coronavirus 229E (229E), coronavirus NL63 (NL63), coronavirus OC43 (OC43), parainfluenza virus 1 (PIV1), parainfluenza virus 2 (PIV2), parainfluenza virus 3 (PIV3), parainfluenza virus 4 (PIV4), rinovirus A/B/C (HRV A/B/C), enterovirus (HEV), bocavirus 1/2/3/4 (HBoV)y el Control Interno (*Internal Control*, IC).

En la PCR, la eficiencia puede reducirse por inhibidores que se pueden presentar en las muestras clínicas. Un control interno (IC) es incorporado dentro del producto como un conjunto en el control del proceso para monitorear el aislamiento de ácidos nucleicos y verificar una posible inhibición de la PCR. El IC es co-amplificado con los ácidos nucleicos objetivos en las muestras clínicas.

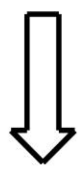
El sistema Uracil-DNA glicosilasa (UDG)-dUTP es empleado en el AnyplexTM RV16. El sistema (UDG)-dUTP es usado comúnmente cuando se realiza la PCR para eliminar los amplicones por arrastre usando residuos de uracil del ADN por ensición de la unión N-glicosil.

.

2. Procedimiento General

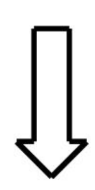
Muestra

(Aspirados nasofaríngeos, hisopado nasofaríngeo y lavado bronquio-alveolar)



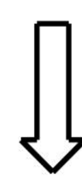
Aislamiento de ácidos nucleicos

ADN / ARN Viral



Transcripción Reversa

Primera hebra ADN / cADN



Amplificación y detección mediante el Sistema Anyplex™ II

Análisis de Resultados

< Procedimiento general con el kit Anyplex™ II RV16 (V1.1) Detection >

ANTECEDENTES

1. Infección por Virus Respiratorios

La infección respiratoria tiene dos categorías: infecciones del tracto respiratorio alto e infecciones del tracto respiratorio bajo. La infección del tracto respiratorio alto es causada por patógenos que invaden por via nasal, faríngea, auris media, espenculus, etc. Alguna infección detectada en el tracto respiratorio que es bajo como la laringe es categorizada como infección del tracto respiratorio bajo. Entre las infecciones del tracto respiratorio bajo, las infecciones virales pueden dividirse en cuatro grandes grupos llamados, pneumonia, bronquiolotis, tos y traqueobronquitis. Las diferencias de edad para cada virus están presentes en las víctimas que se infectan. Además, los síntomas pueden diferir en pacientes que tienen el mismo tipo de virus. Aunque cada virus puede causar síntomas para todos los tipos de infecciones del tracto respiratorio bajo, algunos síntomas aparecen con frecuencia en unas infecciones específicas que en otras. Por ejemplo, el VSR puede aparecer en todas las edades desde infantes a adultos, pero este causa infección respiratoria en el tracto respiratorio superior de adultos y bronquiolotis en bebes. Usualmente, el VSR causa neumonía en infantes y más pacientes quienes son diagnosticados como infecciones del tracto respiratorio bajo son más jóvenes que 2 años, en su mayoría más jóvenes de 6 meses de edad.
Aunque los adultos tienen buenos niveles de inmunidad por las repetidas infecciones por virus respiratorios desde su infancia, el sistema inmune es limitado, imperfecto y vulnerable a los virus respiratorios. Sin embargo, los pacientes con sistema inmune decaído pueden desarrollar infecciones del tacto respiratorio bajo tales como: neumonía. En casos por Influenza, hay variación en el tamaño antigénico viral, pacientes con enfermedades subyacentes pueden dar como resultado la muerte del paciente. Investigaciones recientes afirman que el VSR produce los mismos síntomas que la gripe.

2. Virus de la influenza

Los virus de la influenza (Familia *Orthomyxoviridae*) presentan un genoma de cadena sencilla de ARN que contiene 8 segmentos distintos y separados de ribonucleoproteinas. Esta segmentación del genoma es poco común entre los virus y muy probablemente contribuye al rápido desarrollo de nuevas variedades de influenza a través del intercambio de segmentos genómicos entre virus diferentes que infectan la misma célula. Existen 3 tipos: A, B y C. A y B son los virus más comunes. Especialmente el virus tipo A es conocido como el más común por infectar no solo humanos, también aves y varios tipos de mamíferos. Entre los virus de influenza que invaden humanos, el H1N1 y H3N2 son un problema por infectar niños y ancianos. El tipo B y C se conocen solamente en el humano. Inician los síntomas por influenza son descarga nasal, congestión nasal, dolor de

garganta, tos, fiebre, nasofaringitis o síntomas similares por rinitis aguda, escalofrió, y dolor muscular, los cuales pueden representar un resfriado más severo que regular. Característicamente, los síntomas de influenza llevan alta fiebre y desarrolla complicaciones acompañadas de infecciones bacterianas.

3. Virus Sincitial Respiratorio (RSV)

El virus sincitial respiratorio (Familia *Paramyxoviridae*) es un virus envuelto con un genoma de ARN negativo de cadena sencilla.el VSR tiene alta frecuencia de ocurrencia entre otras enfermedades respiratorias. Está caracterizada como clínicamente significativa por causar muertes en bebes con malformaciones congénitas cardiacas, infantes prematuros, y bebes con reciente cirugía de corazón abierto. La bronquiolitis es la tipo más común de VSR en infantes, pero no aparece tan a menudo después de un año de edad. De otra mano, la neumonía es un problema para todos los infantes. El VSR es el responsable de desarrollar el 45-75% de bronquiolitis, 15-25% de neumonía en infantes, y 6-8% de tos. El VSR fue originalmente conocido como patógenos que desarrollaban enfermedades en bebes, pero estudios recientes mostraron que el VSR ocurre en adultos puede producir resultados tan grave como la gripe, tales como la transferencia y llevando a la muerte. Además, si los pacientes tienen el sistema inmune suprimido y son infectados por VSR que causa neumonía, la probabilidad de que se produzca la muerte es de un 50%.

4. Adenovirus (AdV)

Los adenovirus (Familia *Adenoviridae*) son virus no envueltos con ADN de doble cadena. De estos hay siete especies divididas de la A a la G y 57 números de serotipos. El síntoma más común de la infección por adenovirus es infección en el tracto respiratorio superior la cual se relaciona con las especies B y C. Junto con AdV, inflamación de ojos, amigdalitis, timpanitis, laringitis y gastro-enteritis aparecen en los pacientes. Si los niños son infectados por AdV, pueden desarrollar bronquioloitis o neumonía, la cual puede ser severa. Más personas tienen la habilidad de cuidarse ellos mismos, pero el AdV puede causar la muerte en pacientes con deficiencia en la inmunidad y raramente algunos individuos saludables mueren por la infección.

5. Metapneumovirus (MPV)

Los MPV (Familia *Paramyxoviridae*) son virus envueltos con un genoma de ARN negativo de cadena sencilla. El MPV es un patógeno viral respiratorio que se ha expandido por todo el mundo y tiene un 5 a 10% de oportunidad de co-infección con otros virus respiratorios. Sus síntomas son similares con los del VSR. El MPV puede producir infecciones respiratorias menores tales como bronquiolitis, crup, neumonía, infecciones respiratorias severas, y es conocida por estar relacionada con el deterioro del asma. Entre los niños que son hospitalizados por infecciones en el tracto respiratorio bajo, los pacientes con MPV positivas tienen fiebre (86%), tos (90%), y disnea (80%) como síntomas comunes. Sin embargo, las sibilancias (56%) se muestran en niños que eran sanos antes de la infección y niños con historia médica de asma. El 12% de los pacientes

que fueron tratados por infecciones en el tracto respiratorio bajo se les detectó MPOV positivo. Este porcentaje es alto después de la de VSR. También el MPV es una de las mayores causas de ataque de asma bronquial en niños y adultos.

6. Coronavirus (CoV)

Los CoV (Familia *Coronaviridae*) son virus envueltos con un genoma de ARN positivo de cadena sencilla. Los CoV tienen varios tipos y cada uno puede producir infecciones a mamíferos y aves. El CoV se divide serológicamente en tres grupos (I, II y III) de acuerdo a su antigenicidad. Sin embargo, después del descubrimiento del síndrome respiratorio agudo en 2003 fue originado en animales, y se creó un cuarto grupo. Entre el CoV que fue aislado en humanos, HCoV-229E es el patógeno representativo para el grupo I, el cual tiene antigenicidad, y HCoV-OC43 es la cadena representativa patógena del grupo II. Ambos debido al gran tamaño del genoma y el método único de composición, virus resultantes de la recombinación de genes se forman fácilmente. Además, el CoV tiene diversos tipos de variación antigénica. El CoV tiene síntomas similares al resfriado común tales como descarga nasal, irritación nasal, congestión y estornudos. En el caso de los niños, los síntomas usuales incluyen dolor de garganta, adenitis cervical, fiebre leve y en ocasiones ataques de asma. El CoV junto al 229E y OC43 produce enfermedades del tracto respiratorio alto en niños y adultos, el rango de frecuencia y grado de severidad son diferentes en cada temporada.

7. Virus de la Parainfluenza (PIV)

Los PIV (Familia *Paramyxoviridae*) son virus envueltos con un genoma de ARN negativo de cadena sencilla. Los 4 tipos existentes, del 1 al 4, se presentan en humanos y se transmiten por contacto directo con los pacientes y gotas infectadas. Estos virus tienen 2-4 días de periodo latente. Los síntomas son similares a la enfermedad respiratoria. También, hay fiebre y síntomas generales raros. El 80% resulta en enfermedades del tracto respiratorio alto. El 50% de pacientes hospitalizados con bronquitis, 15% de pacientes hospitalizados con bronquiolitis y el 15% de pacientes hospitalizados con neumonía y todos desarrolladas por PIV. Los PIV del tipo 1 y 2 son la causa principal de laringo-traqueo-bronquitis en niños de entre 2 y 4 años de edad. El PIV tipo 3 puede causar laringitis pseudomembranosa, pero es la mayor causa de bronquiolitis y neumonía, la cual es más severa en niños menores de 1 año. El PIV tipo 4 ha sido categorizado como el virus que más fácil se transforma en formas más severas. La duración de los síntomas es diversa. El promedio es de 4-5 días, pero la detección puede tomar 2-3 semanas después de la infección con el virus debido a la baja potencia previniendo su rápido descubrimiento. Si la fiebre tarda más de 5 días, infecciones secundarias por virus tales como timpanitis y neumonía pueden ocurrir. Para adultos, las enfermedades en el tracto respiratorio alto son comunes, pero puede resultar en la muerte por neumonía para pacientes con sistema inmune deprimido tales como los que tienen trasplante de médula ósea.

8. Enterovirus (HEV)

Los enterovirus no tienen envoltura, con un genoma de una cadena simple y positiva de RNA. El HEV tiene 70 serotipos que se dividen en los grupos: poliovirus, coxsackievirus A y B, y otros enterovirus. El HEV usualmente entra a los humanos por vía oro-fecal, pero también pueden viajar a través del sistema respiratorio por infecciones a través de las gotas. En su mayoría, los síntomas son similares al resfriado común, pero pueden presentarse otros síntomas tales como parálisis, meningitis aséptica, encefalitis, inflamación respiratoria baja, salpullido, enfermedades en manos, pies y boca, mocarditis, pericarditis, y dolor de pecho.

9. Rinovirus (HRV)

Los HRV (*Familia Picornaviridae)* son virus no envueltos con genoma de ARN positivo de cadena sencilla. Los HRV tienen 101 serotipos y son conocidos como la causa más común de resfriado. El tamaño del HRV tiene varios números de serotipos, y el serodiagnóstico es difícil. Sin embargo, este se puede diagnosticar a través del PCR en la secreción nasal.
No todos los HRV presentan los síntomas; unos comunes son rinitis, y faringitis que hacen parte de las inflamaciones respiratorias altas. Congestión nasal, descarga nasal y dolor de cabeza ocurren durante los 2-4 días del periodo latente y el 30-40% está acompañado por tos. Fiebre leve puede aparecer en una semana, pero dura más de dos semanas para el 35% de los niños. En algunos casos, las enfermedades del tracto respiratorio bajo severas pueden agravarse y resultar en asma para niños y bronquitis crónica en adultos.

10. Bocavirus (HBoV)

Los HBoV (Familia *Parvoviridae*) son virus no envueltos con genoma de ADN de cadena sencilla. Los HBoV han sido reportados a nivel mundial con una frecuencia que va del 1.5% al 11.3% en las muestras respiratorias analizadas de individuos con enfermedad respiratoria aguda. Se ha observado que los HBoV se asocian con un amplio espectro de enfermedades del tracto respiratorio tanto superior como inferior, un tercio de las cuales es neumonía. Como una de las causas de bronquiolitis y neumonía, este tiene un 4% de oportunidad de asociación con otras enfermedades respiratorias, y tiene una alta probabilidad de producir ataques de asma.

REACTIVOS:

Los reactivos contenidos en un kit son suficientes para 50 determinaciones.

REF. RV7G01Y

Anyplex II RV16 detection			
SIMBOLO	**CONTENIDO**	**VOLUMEN**	**DESCRIPCION**
Primer	4X RV16 A TOM	250 UL	TOCE Oligo Mix (TOM): Reactivo para la amplificación y detección
Primer	4X RV16 B TOM	250UL	TOCE Oligo Mix (TOM): Reactivo para la amplificación y detección
Premix	4X Anyplex PCR Master Mix (con UDG)	250 ul x 2	- ADN Polimerasa - UDG Uracil DNA Glicosilasa - Tampón conteniendo dNTPS
CONTROL +	RV16 PC1	80 ul	Control Positivo (PC) - Mezcla de clones de patógenos positivos
CONTROL +	RV16 PC2	80 ul	Control Positivo (PC) - Mezcla de clones de patógenos positivos
Water	Agua libre de DNA/RNasas	1000 ul	Ultrapura Grado PCR Control negativo: Agua esterilizada como control negativo.
CONTROL IC	RV16 IC	500 µL	Control Interno Exógeno (IC)
i	Manual de usuario		

Anyplex™ es una marca registrada de Seegene Inc.

MANEJO Y ALMACENAMIENTO

Los componentes de Anyplex™ II RV16 Detection deben almacenarse a -20° C y son estables hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta. El congelamiento y descongelamiento repetido debe evitarse ya que podría reducir la sensibilidad. Si los reactivos serán usados de manera intermitente, deberán almacenarse en alícuotas.

MATERIAL REQUERIDO NO INCLUÍDO

- Guantes desechables libres de talco (látex o nitrilo)
- Pipetas (ajustables) y puntas estériles
- Microcentrífuga para tubos de 1.5 ml
- Kit para aislamiento de ácidos nucleicos (ver Aislamiento de Ácidos Nucleicos)
- Proteinasa K (para SEEPREP12, No. De Cat. P4850, SIGMA)
- Kit de Transcripción reversa (No. De Cat. SGRT801, Seegene)
- Máquina de hielo
- Centrífuga de mesa
- Agitador *vórtex*
- Equipo para PCR en tiempo real CFX-96™ (Bio-Rad)
- Tiras de 8 tubos de bajo perfil de 0.2 ml sin tapas (color blanco, No. Cat. TLS0851, Bio-Rad)
- Tiras de 8 tapas planas de grado óptico (No. Cat. TCS0803, Bio-Rad)
- Plato de 96 pozos, pozo blanco. (cat. No. HSP-9655, Bio-Rad)

PROTOCOLO

1. Toma de Muestra, Almacenamiento y Transporte

Nota: Todas las muestras tienen que ser tratadas como materiales potencialmente infecciosos. Sólo las muestras que sean recogidas, transportadas y almacenadas y atiendan estrictamente las siguientes normas e instrucciones, serán permitidas:

Nota: Para garantizar una alta calidad de las muestras, se deben transportarse lo más rápidamente posible. Las muestras tienen que ser transportadas en las condiciones de temperatura indicadas.

A. Recolección de las muestras

Aspirado nasofaríngeo, hisopado nasofaríngeo, lavado bronquioalveolar

- El aspirado nasofaríngeo, el hisopado nasofaríngeo, y el lavado bronqueoalveolar son examinadas rutinariamente para patógenos respiratorios comunes.
- Obtener las muestras puede ser difícil en algunos pacientes. En tales casos, el hisopado nasofaríngeo puede recolectarse simple y eficientemente con el hisopo de nylon, El medio universal de transporte (UTM) y el eNat.

Fabricante	Dispositivo de recolección de muestra	Categoria No.
COPAN	ESwab	482CE
COPAN	eNat	606CS01P
COPAN	UTM con hisopos	360C/305C
DIAGNOSTIC HYBRIDS	UTM con hisopo flexible	403/406C

Nota: nosotros recomendamos el uso de UTM o eNat, cuando se aplican en el MICROLAM NIMBUS IVD, MICROLAB STARTlet.

B. Almacenamiento de muestras

La sensibilidad de un ensayo puede disminuir si las muestras son congeladas y descongeladas rutinariamente durante períodos de tiempo prolongados.

- Almacene las muestras a 4° C hasta por 72 horas antes de su procesamiento. Almacene las muestras restantes a < - 70° C.

C. Transporte de muestras

Para asegurar la calidad de las muestras, éstas deben transportarse tan pronto como sea posible. Las muestras deben transportarse en las condiciones de temperatura indicadas.

- Transporte las muestras respiratorias entre 2-8° C.
- Asegúrese de conocer todas las regulaciones aplicables para el transporte de agentes etiológicos cuando traslade las muestras respiratorias.

2. Aislamiento de Ácidos Nucleicos

Diversos fabricantes ofrecen kits para aislamiento de ácidos nucleicos. La cantidad de muestra resultante puede variar dependiendo del protocolo utilizado. Los kits de aislamiento deben ser validados para usar con este kit.

A. Control Interno

Nota: El control Interno se incluye en el kit. Esto le permite al usuario monitorear el procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos y la posibilidad de inhibición de la PCR.

- Agregar 10 µL de IC a cada mezcla de la solución de muestra y buffer de lisis o directamente al buffer de lisis.

Nota: En el caso de adicionarlo directamente al buffer de lisis, es posible que se formen burbujas, debe ser cuidadoso.

B. Kits de Preparación manual

Kit de Aislamiento	Fabricante	No. De Cat.	Vol. Recomendado
QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit*	QIAGEN	57704	Muestra: 190 µL Elución 40 µL
Ribo_spin vRD (Viral RNA/DNA Extraction kit)	GeneAll	302-150 SG1701	Muestra: 290 µL Elución: 40 µL

*Para ambos virus respiratorios y muestras con bacterias respiratorias.

C. Equipos de Purificación Automatizada (SEEPREP12™)

Equipo de Extracción Automatizada	Fabricante	No. De Cat	Vol. Recomendado
SEEPREP12™	NorDiag	SPN1200*	
SEEPREP12™ Viral NA Kit	NorDiag	SPN1004*	Muestra: 530 µL Elución: 60 µL

***SI usted desea adquirir los productos mencionados a través de Seegene, Inc, por favor use este número de catálogo**

C-1. SEEPREP12™

1) Adicione 10 μL de Proteinasa K (20mg/mL) a cada tubo estéril para muestra de 1.5 mL debidamente etiquetado.
2) Transfiera 540 μL de muestra (incluyendo los 10 μL del RV16 IC) al tubo que contiene los 10 μL de Proteinasa K, mezcle el contenido mediante ligeros golpecillos.
3) Coloque el tubo de elución de 1.5 mL en el interior del equipo.
4) Presione “***Continue***” en la primera pantalla para permitir que el equipo se inicie.
5) Presione “***Start protocol***” en el menú principal del SEEPREP12™.
6) En el menú de selección de protocolos, presione “**SPN Viral NA**”
7) En el menú de selección de volumen de muestra, presione “**550 μL**” y en la selección del volumen de elución, presione “**60 μL**”.
8) Siga las instrucciones en pantalla para cargar el instrumento.
9) Después de que todos los pasos se han completado, cierre la puerta y comience el ensayo.

C-2. MICROLAB NIMBUS IVD

Nota: Mirar el manual de operación del MICROLAB NIMBUS IVD.

Sistema de Purificación Automatizado	Fabricante	Vol. recomendado
MICROLAB NIMBUS IVD	Hamilton	
STARMag 96 Virus	Seegene	Muestra: 600 μl Elución: 100 μl

C-3. MICROLAB STARlet

Nota: Observar el manual de operación del MICROLAB STARlet

Sistema de Purificación Automatizado	Fabricante	Vol. recomendado
MICROLAB STARlet	Hamilton	
STARMag 96 Virus	Seegene	Muestra: 600 μl Elución: 100 μl

3. Transcripción reversa

Nota: las puntas resistentes a los aerosoles y guantes ajustados deben usarse para la preparación de las muestras. Tenga precaución para evitar la contaminación cruzada.
Nota: Descongelar completamente.
Nota: Establecer todas las reacciones en el hielo para minimizar el riesgo de degradación de ARN.
Nota: Centrifugue brevemente los tubos de reactivos para remover las gotas del iterior de la tapa.

A. Síntesis del kit de cDNA para el usuario de configuración automática mediante un instrumento de manejo de líquidos

Fabricante	Kit de Transcripción Reversa	No. De Cat.
Seegene	**cDNA Synthesis Automix**	**SGRTA01**

Nota: para las instrucciones detalladas de operación, refiérase al Manual de Operación del STARlet y NIMBUS para Anyplex II RV16 Detection.

1) Ponga los tubos de reactivos y de muestras en el instrumento.
Prepare la siguiente mezcla en un tubo de PCR

2 µl	Random Hexamer
8 µl	RT Buffer
2 µl	RT Enzima Mix
8 µl	Acido nucleico de muestra
20 µl	Volumen Total

Nota: Mezcle los reactivos mediante ligeros golpecillos. Centrifugue brevemente para recuperar los líquidos remanentes de las paredes de los tubos.

2) Realice las reacciones de síntesis de cADN como se muestra a continuación:

Segmento	Número de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	25° C	5 min
2	1	37° C	60 min
3	1	95° C	2 min

Nota: Almacene todas las muestras de cADN a -20° C hasta su uso.

B. Kit de síntesis de cDNA para uso manual

Fabricante	Kit de Transcripción Reversa	No. De Cat.
Seegene	cDNA Synthesis Premix	SGRT801

Nota: Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas.

Nota: El kit se compone de tubos de 8 tiras los cuales son alícuotas del master mix.

1) Prepare la siguiente mezcla en un tubo de PCR que contiene el premix.

10 µl	Premix alicuotado
2 µl	Random Hexamer
8 µl	Acido nucleico de muestra
20 µl	Volumen Total

Nota: use una pipeta nueva para cada muestra.
Nota: Mezcle los reactivos por golpecitos. Centrifugue brevemente para recoger el líquido residual de las paredes de los tubos.

2) Realice las reacciones de síntesis de cADN como se muestra a continuación:

Segmento	Número de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	25° C	5 min
2	1	37° C	60 min
3	1	95° C	2 min

Nota: Almacene todas las muestras de cADN a -20° C hasta su uso.

4. Preparación del PCR en tiempo real

Nota: deben usarse los tubos y tapas correctas. (ver MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS)
Nota: las puntas resistentes a los aerosoles y guantes ajustados deben usarse para la preparación de las muestras. Tenga precaución para evitar la contaminación cruzada.
Nota: Descongelar completamente.
Nota: Centrifugue brevemente los tubos de reactivos para remover las gotas del iterior de la tapa.

A. Preparación de la PCR Master Mix.

5 µl	4X RV16 A TOM o B TOM
5 µl	4x Anyplex PCR Master Mix (con UDG)
2 µl	Agua libre de RNasa
12 µl	Volumen Total de PCR Mastermix

Nota: Calcular la cantidad necesaria de cada reactivo necesitado basado en el nímero de reacciones (muestras y controles)

B. Mezcle por inversión 5 veces o en el vortex.
C. Tome una alícuota de 12 µl de la PCR Mastermix en tubos de PCR y cierre las tapas.
D. Adicione 8 µl de cada muestra de ácidos nucleicos dentro del tubo.

12 µl	PCR Master Mix
8 µl	Muestra de ácido nucleico
20 µl	Volumen Total de reacción

Nota: Utilice una punta de pipeta nueva con cada muestra diferente.
Nota: Para el **Control Negativo**, utilice 8 µL de agua libre de RNasa en lugar de muestra de ácido nucleico.
Nota: Para el **Control Positivo**, utilice 8 µL de RV16 PC 1 ó RV16 PC 2 (vea la siguiente página)

Nota: Evite la contaminación cruzada del PCR *Mastermix* y las muestras con el Control Positivo.
Nota: el tubo de PCR debe ser mezclado y centrifugado antes de la reacción de PCR. Esto se necesita para comprobar el líquido que contiene todos los componentes de la PCR que está en el fondo de cada tubo de PCR.
Nota: En el caso del CFX-96™, no etiquete la tapa de los tubos de reacción ya que la fluorescencia es detectada a través de la tapa.

- **Control Positivo**

Se incluyen **dos tubos de control positivo** en el kit; RV16 PC 1 y RV16 PC 2.

RV16 **PC 1** incluye las clonas de 5 patógenos para el panel A (PIV4, AdV, PIV1, PIV2, PIV3) y 5 patógenos para el panel B (MPV, HBoV, CoV 229E, CoV NL63, CoV OC43).

RV16 **PC 2** incluye las clonas de 3 patógenos para el panel A (Flu A, Flu B, HRV), 3 patógenos para el panel B (RSVA, RSVB, HEV) y el control interno.

Nota: Para correr la reacción del control positivo, prepare dos tubos de PCR para cada panel, cuatro tubos de PCR en total:

Para el panel A, un tubo con el RV16 PC 1 y otro con el RV16 PC 2.
Para el panel B, un tubo con el RV16 PC 1 y otro con el RV16 PC 2.
(ver RESULTADOS)

Control Positivo del Panel A

Nombre	FAM		HEX			Cal Red 610			Quasar 670	Autointerpretación
	PIV4	AdV	PIV1	PIV2	PIV3	FluA	FluB	HRV	IC	
PC 1	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**	**Control Positivo (+)**
PC 2	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**	**Control Positivo (+)**

Control Positivo del Panel B

Nombre	FAM		HEX			Cal Red 610			Quasar 670	Auto interpretación
	MPV	HBoV	229E	NL63	OC43	RSVA	RSV	HRVB	IC	
PC1	**+**	**+**	**+**	**+**	**+**	**-**	**-**	**-**	**-**	**Control Positivo (+)**
PC 2	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**+**	**+**	**+**	**+**	**Control positivo (+)**

CONFIGURACIÓN DEL EQUIPO PARA PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. Equipo para PCR en tiempo real CFX-96^{TM} (Bio-Rad)

1.1 Programación del Equipo para PCR en tiempo real

Nota: La programación del ensayo en el Equipo de PCR en tiempo real CFX-96^{TM} (Bio-Rad) para la detección de Flu A, Flu B, RSV A, RSV B, MPV, AdV, 229E, NL63, OC43, HRV A/B/C, HEV, HBoV, PIV1, PIV2, PIV3, PIV4 y el Control Interno (IC) puede dividirse en tres pasos:

- Programación del protocolo
- Programación de la placa
- Inicio del ensayo

A. Programación del protocolo

1) En el menú principal, haga clic en *Protocol* para abrir la ventana de *Experiment Setup*.



Fig. 1. ***Programación del Protocolo****. Realice un nuevo protocolo ó cargue un protocolo ya existente para el experimento.*

2) En *Protocol Editor*, defina el perfil térmico como se menciona a continuación:

Segment	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50℃	4 min
2	1	95℃	15 min
3		95℃	30 sec
4	30	60℃	1 min
5		72℃	30 sec
6	1	55℃	30 sec
7*	1	**Melting curve 55℃ ~ 85℃ (5 s / 0.5℃)**	
8		95℃	30 sec
9	10	60℃	1 min
10		72℃	30 sec
11	1	55℃	30 sec
12*	1	**Melting curve 55℃ ~ 85℃ (5 s / 0.5℃)**	
13		95℃	30 sec
14	10	60℃	1 min
15		72℃	30 sec
16	1	55℃	30 sec
17*	1	**Melting curve 55℃ ~ 85℃ (5 s / 0.5℃)**	

Nota: Lectura de placa en el segmento 7, 12 y 17. Fluorescencia es detectada durante la disociación.

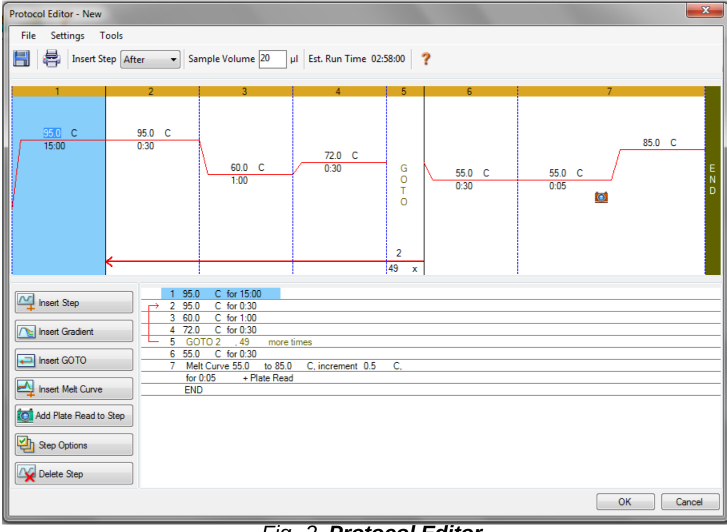


Fig. 2. ***Protocol Editor***

3) Haga clic en *Sample Volume* y modifique el valor a 20 µL.

4) Haga clic en *OK*; se abrirá la ventana *Experiment Setup*.

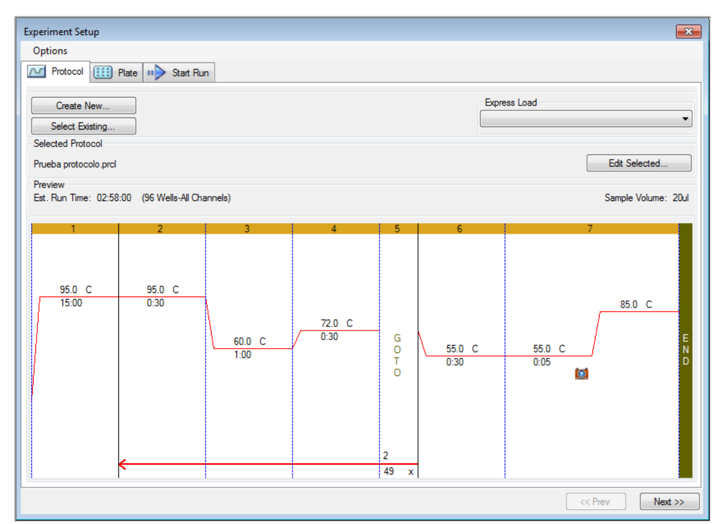


Fig. 3. ***Experiment Setup Protocol***.

B. Programación de la placa

1) En *Experiment Setup Plate*, haga clic en *Create New* para abrir la ventana *Plate Editor* para crear una nueva placa.

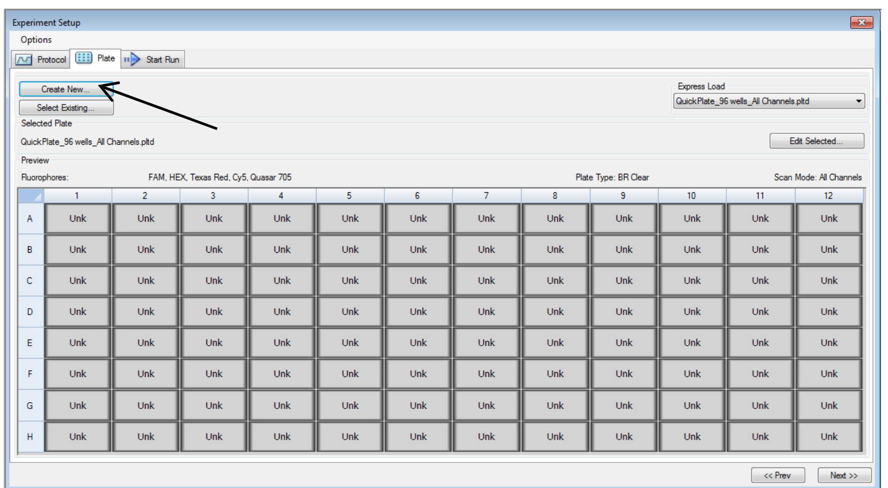


Fig. 4. ***Plate Editor****. Realice una nueva placa o cargue una placa ya existente para el experimento.*

2) Haga clic en *Select Fluorophores* para indicar los fluoróforos (FAM, HEX, CAL Red 610 y Quasar 670) que serán utilizados en el experimento.

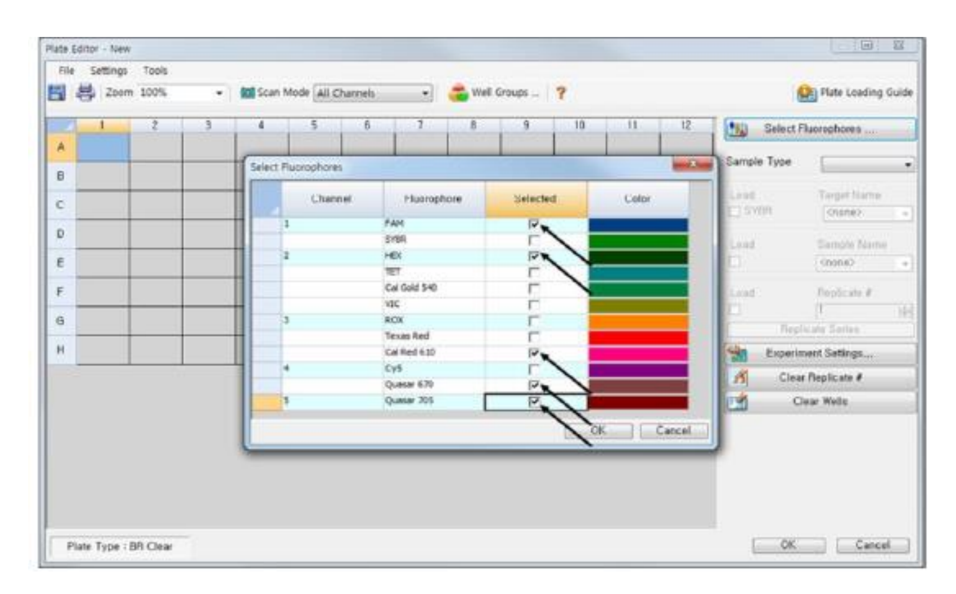


Fig. 5. ***Select Fluorophores****. (FAM, HEX, CAL Red 610 y Quasar 670)*

3) Seleccione los pocillos y haga clic en *Sample Type* en el menú desplegable.
   - **Unknown**: Muestras clínicas
   - **Control Negativo**
   - **Control Positivo**

4) Haga clic en las casillas de verificación apropiadas (FAM, HEX, CAL Red 610 y Quasar 670) para cargar los fluoróforos en los pocillos seleccionados.

5) Digite el nombre de la muestra y PC (PC1, PC2), y presione la tecla enter.
6) En settings del menú principal del Plate Editor, elija el tamaño de la placa (96 pozos) y el tipo de placa (BR White).

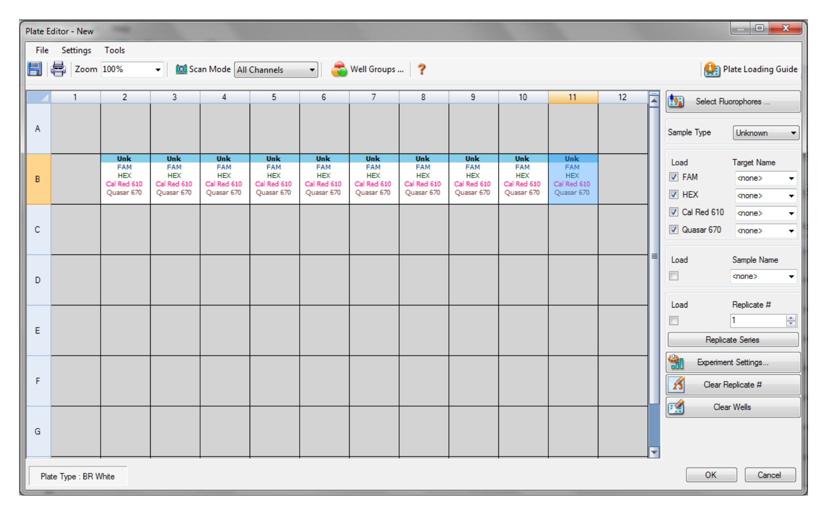


Fig. 6. ***Plate Setup****.*

7) Haga clic en *OK*, y guarde el archivo de la nueva placa.
8) Se abrirá la ventana de *Experiment Setup*.

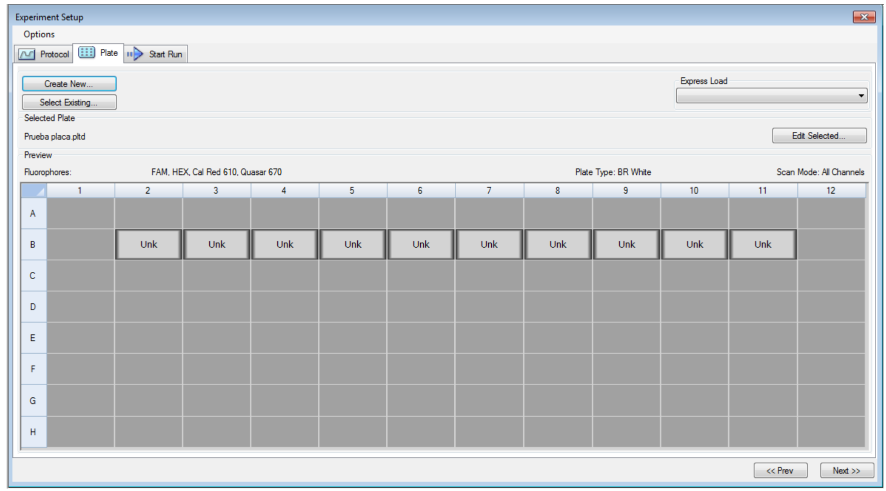


Fig. 7. ***Experiment Setup Plate.***

C. Inicio del ensayo

1) En *Experiment Setup Start Run*, haga clic en *Close Lid* para cerrar la tapa del equipo.

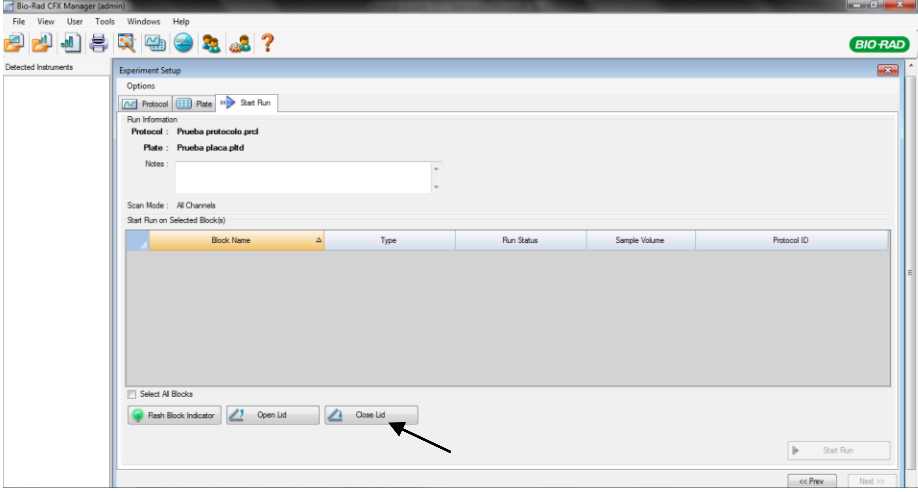


Fig. 8. ***Close Lid****.*

2) Haga clic en *Start Run*.

3) Guarde el archivo del ensayo en la carpeta que usted designe. El equipo iniciará una vez que el archivo se haya guardado.

1.2 Análisis de datos

A. Creación de la carpeta específica para guardar los datos

1. Para guardar los datos de cada punto de fusión del archivo de resultados, cree tres fólderes.
2. El Nombre del folder para el primer dato de punto de fusión es “1”, para el segundo “2”, y para el tercero “3”.

B. Pre-ajustes para el análisis de datos en el CFX-96

1) Después del ensayo, haga clic en la pestaña *Melt curve* para confirmar los resultados de las curvas de disociación.

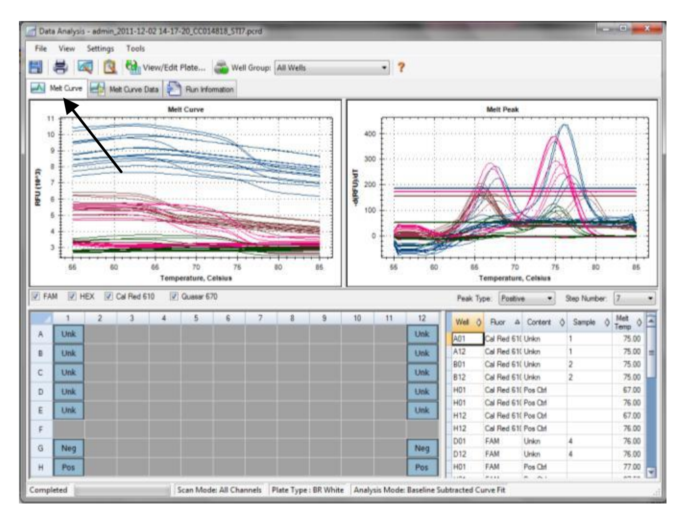
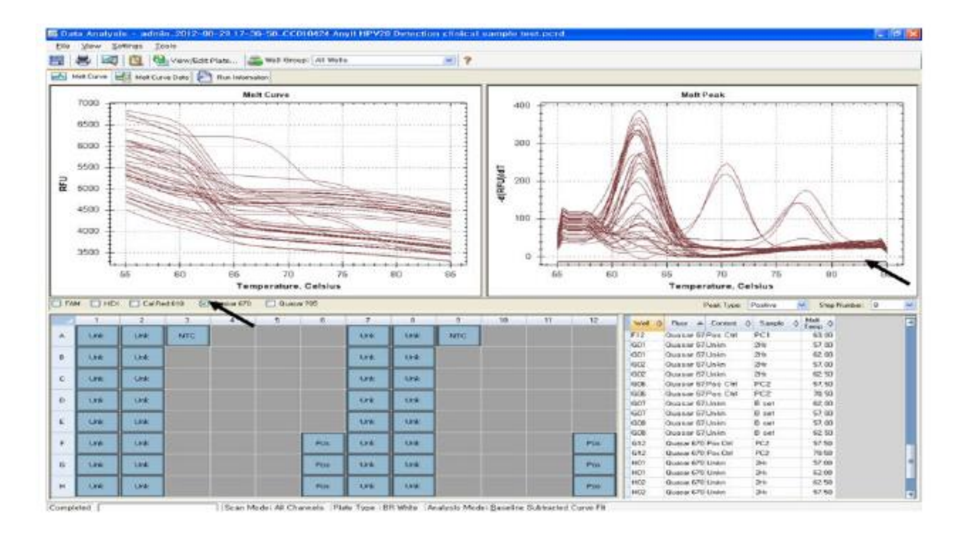
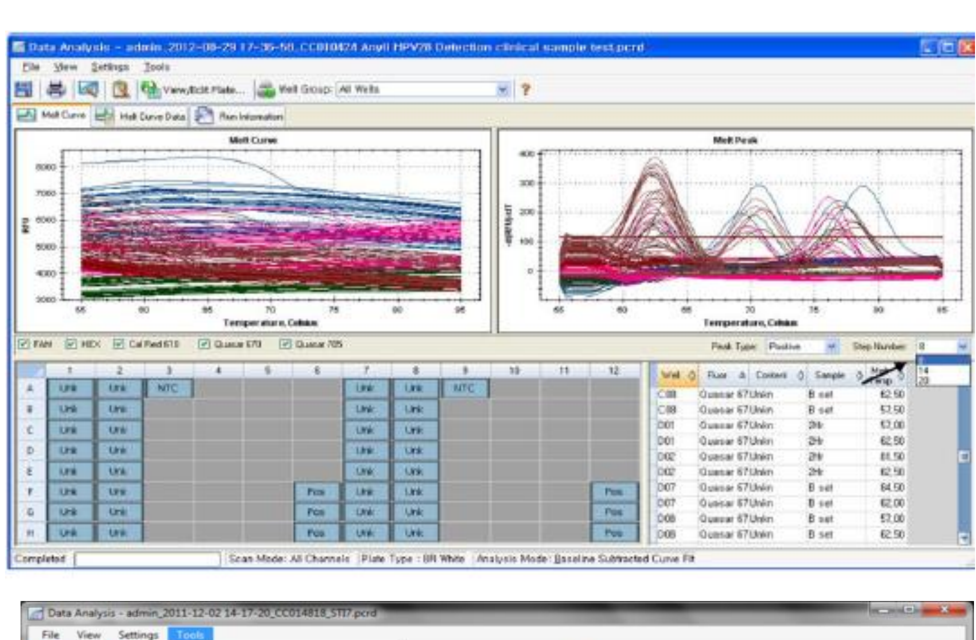


Fig. 9 Resultados Picos de fusión.

2) Seleccione solo Quasar 670, la franja umbral debe ser ajustada a cero.



3) Haga click sobre **Step number "8"** y seleccione exportar todas las hojas de datos a Excel de **herramientas del menú**.



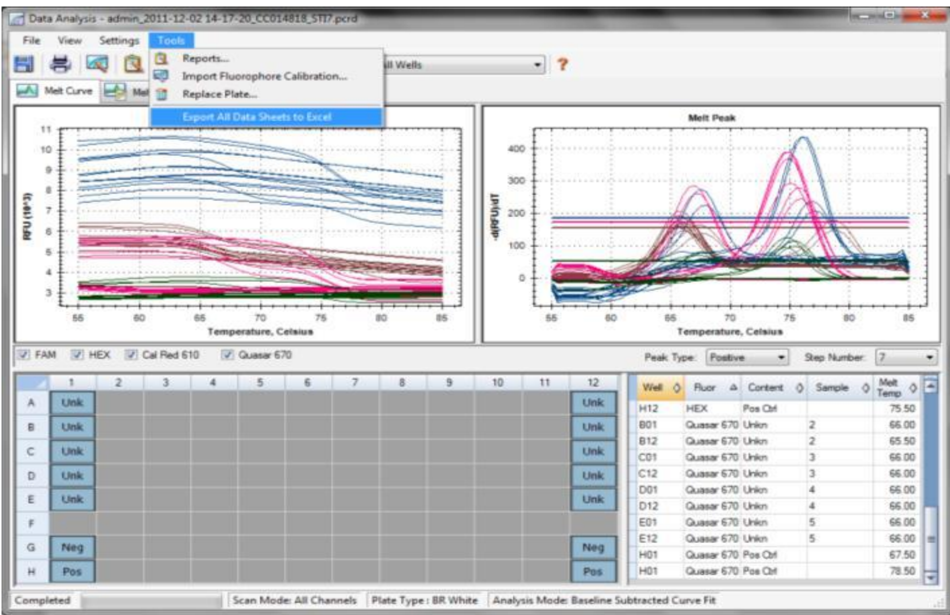


Fig. 11. Exportar todos los datos a Excel

.

4) guarde el resultado de la carpeta “1”, cuando se abra una nueva ventana.

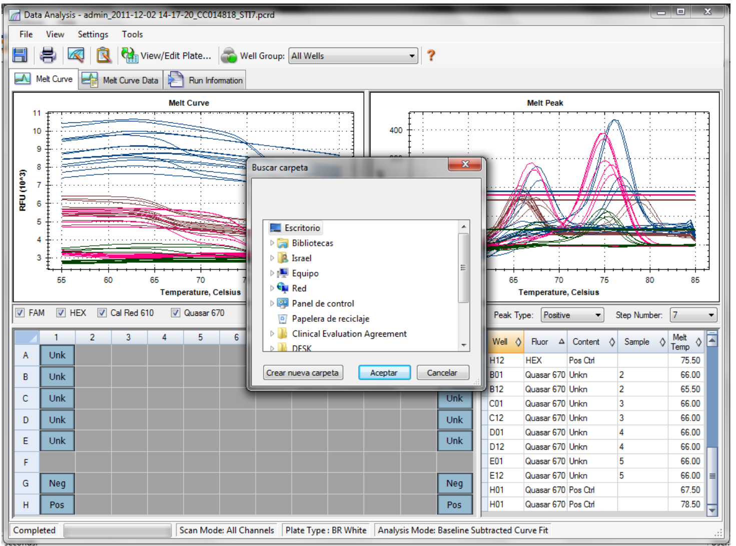


Fig. 12. Exportación de las hojas de análisis de datos a la ubicación especificada.

5) Verifique que los resultados se guardaron en la ubicación designada.

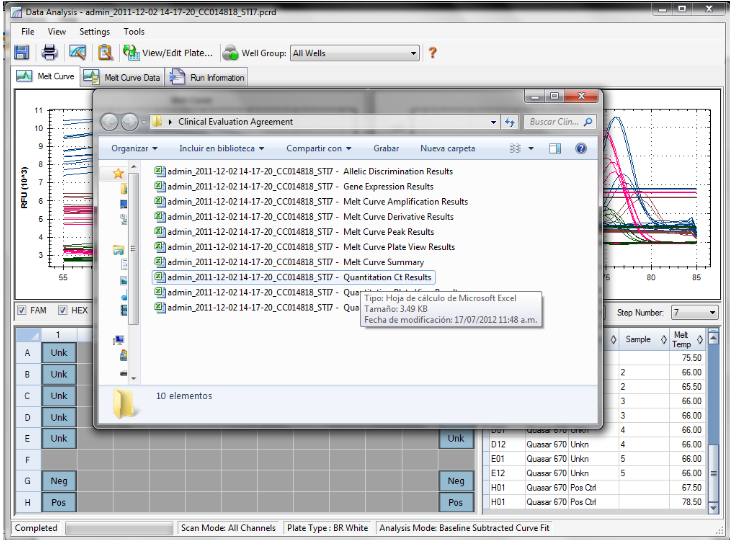


Fig. 12. Archivos de resultados exportados.

6) Regrese al paso 3 y seleccione “Paso número 14” . Repita pasos 4 y 5 y guarde en el archivo “2”. Regrese al paso 3 y seleccione “Paso número 20”. Repita pasos 4 y 5 y guarde en el archivo “3”.

Step number	Designated folder
8	1
14	2
20	3

C. Ajustes para el análisis de datos en el *Seegene Viewer*

1) Abra en pantalla el programa *Seegene Viewer*, haga clic en *Open* para encontrar los archivos guardados.

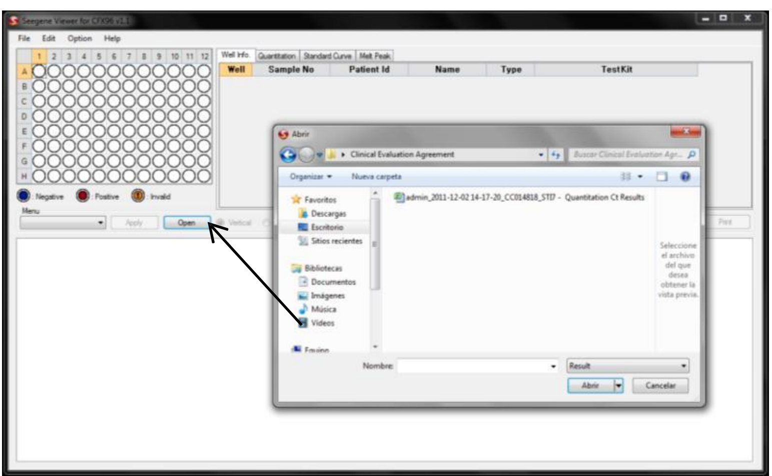


Fig. 14. Seegene viewer

2) Después de abrir el archivo de resultados:

① Seleccione los pocillos de las muestras

② Haga clic en el botón *Menu* y seleccione la prueba realizada de las opciones de la lista

③ Haga clic en *Apply* para obtener el resultado final

Fig. 15. Ajustes para el análisis de datos en el Seegene viewer

3) Verifique el resultado en cada pozo

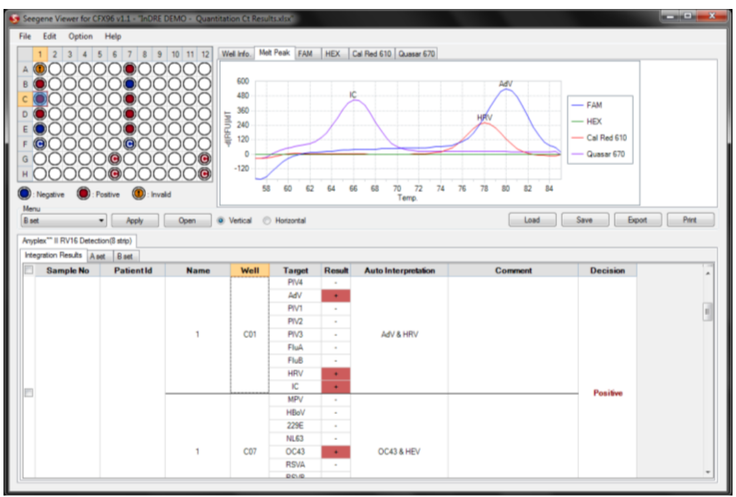
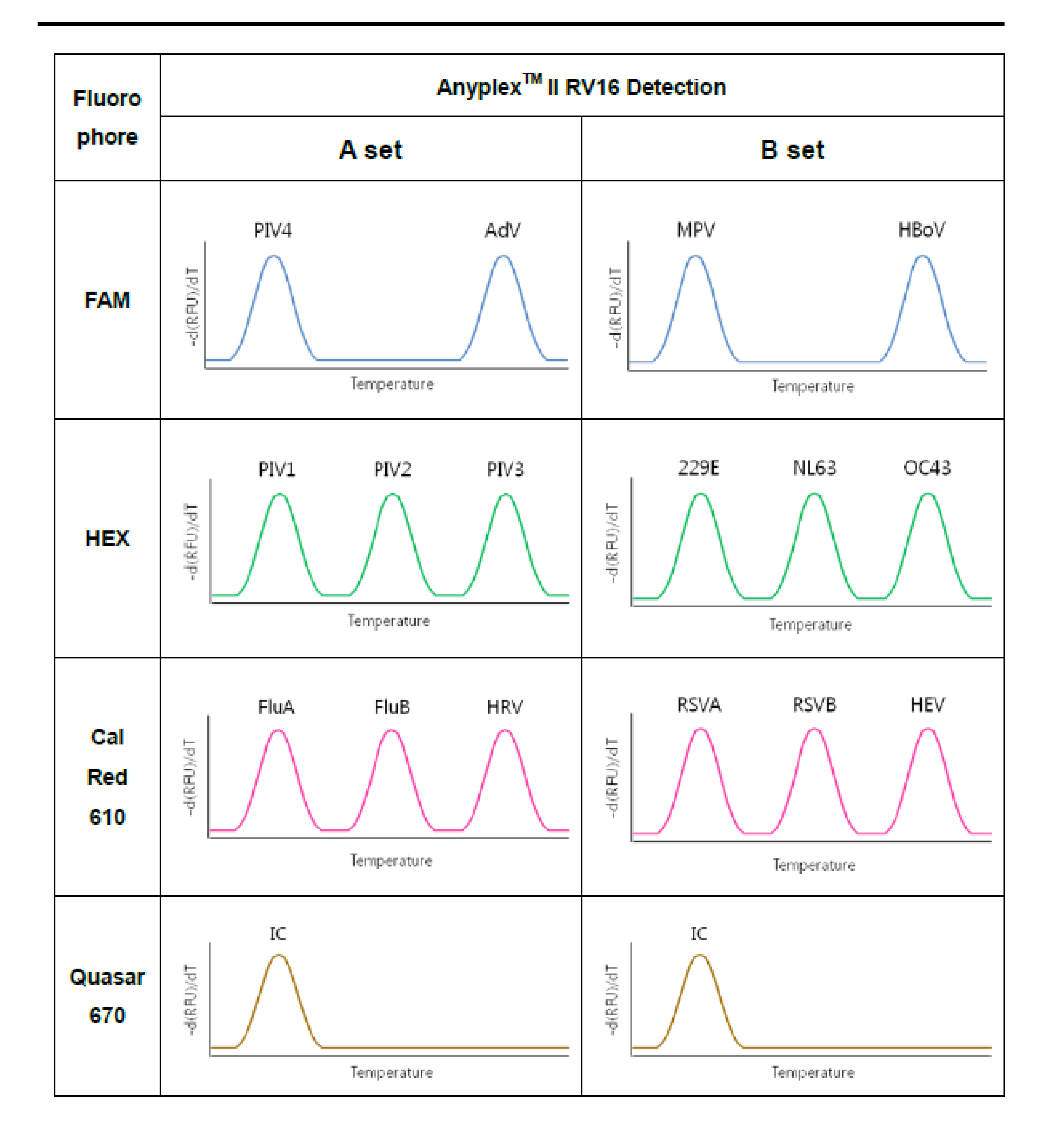


Fig. 16. Resultados de la prueba en el CFX-96 mediante el Seegene viewer

RESULTADOS

1. Información de analitos



2. Interpretación de Resultados

Resultados RV*	Resultado Control Interno*	Interpretación

+++ o ++ o +	+++ o ++	Ácido nucleico objetivo detectado.
+++ o ++ o +	+ o -	Ácido nucleico objetivo detectado. Virus respiratorios adicionales que no fueron detectados pueden estar presentes.
-	+++ o ++	Ácido nucleico objetivo no detectado.
-	+ o -	**Inválido** Señal débil o negativa del control interno es indicativa de una toma de muestra inadecuada, o errores en el procedimiento o presencia de inhibidores. -Procese otra alícuota de la muestra original y repita la prueba.

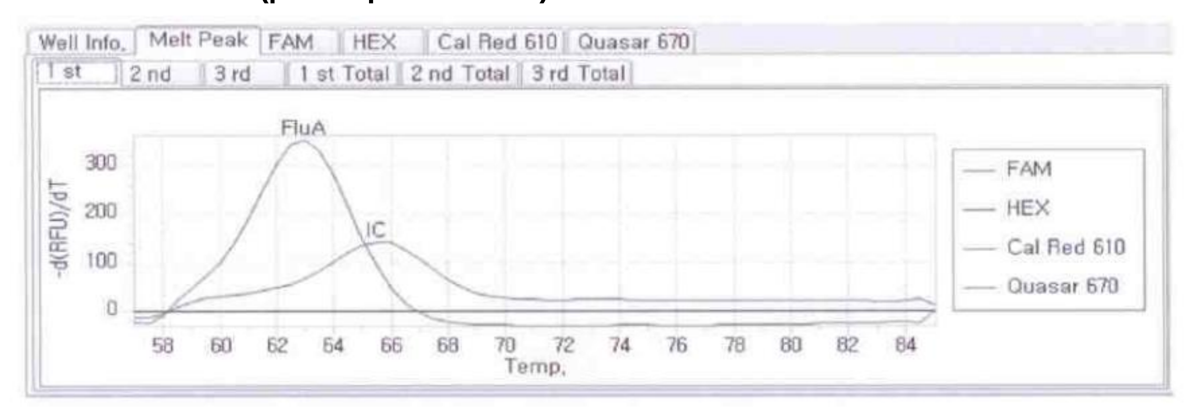
Result	cyclic-CMTA (Cyclic Catcher Melting Temperature Analysis)		
	First CMTA point	Second CMTA point	Third CMTA point
+++	+	+	+
++	-	+	+
+	-	-	+
-	-	-	-

*Si el control Interno o alguna otra señal no es detectada: ver solución de problemas.
La detección del control interno en el canal Quasar 670 no es requerida para resultados positivos. Un alto título de otro analito puede llevar a una señal del control interno reducida o ausente.
Si el resultado es inválido en uno del set A y el set B, realizar repetición.

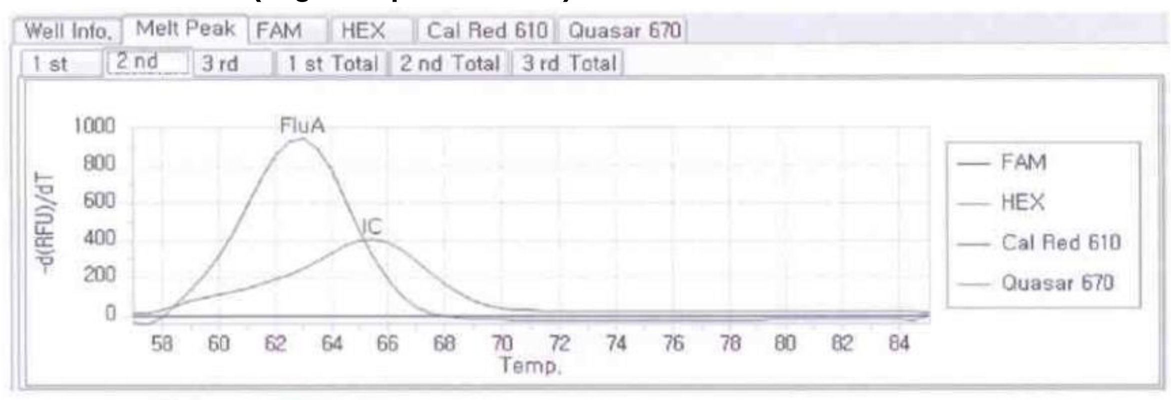
3. Aplicación a Muestras Clínicas

< Muestra 1 – Set A >

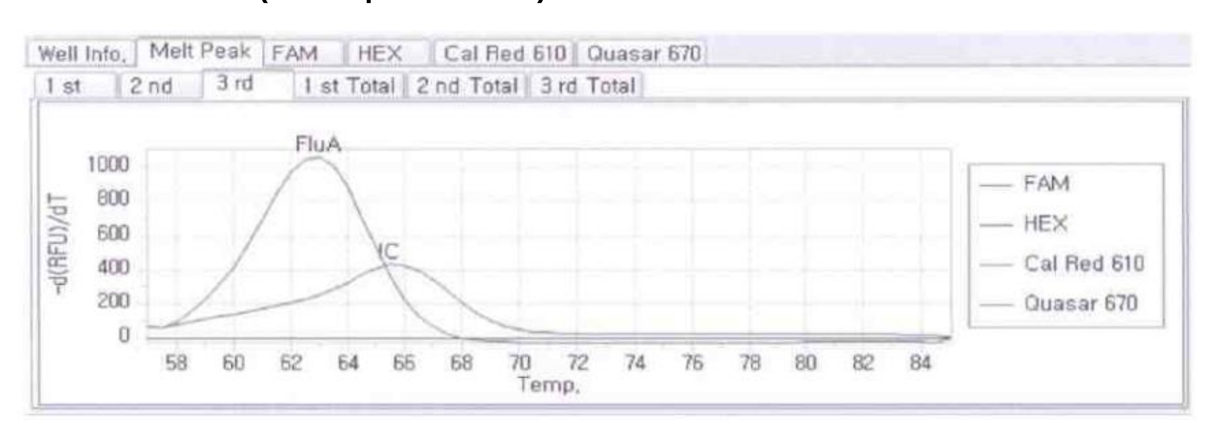
Pico de fusión- 1 (primer punto CMTA)



Pico de fusión- 2 (segundo punto CMTA)



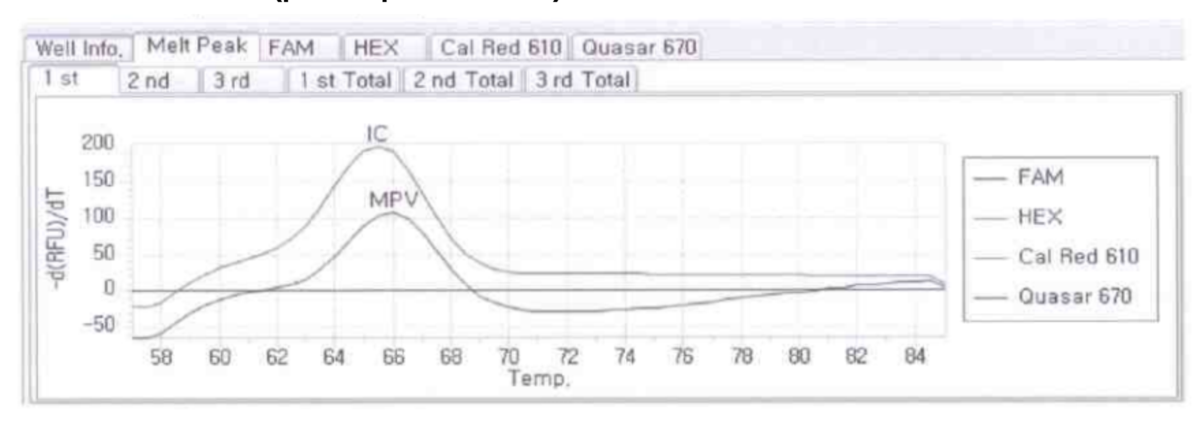
Pico de fusión- 3 (Tercer punto CMTA)



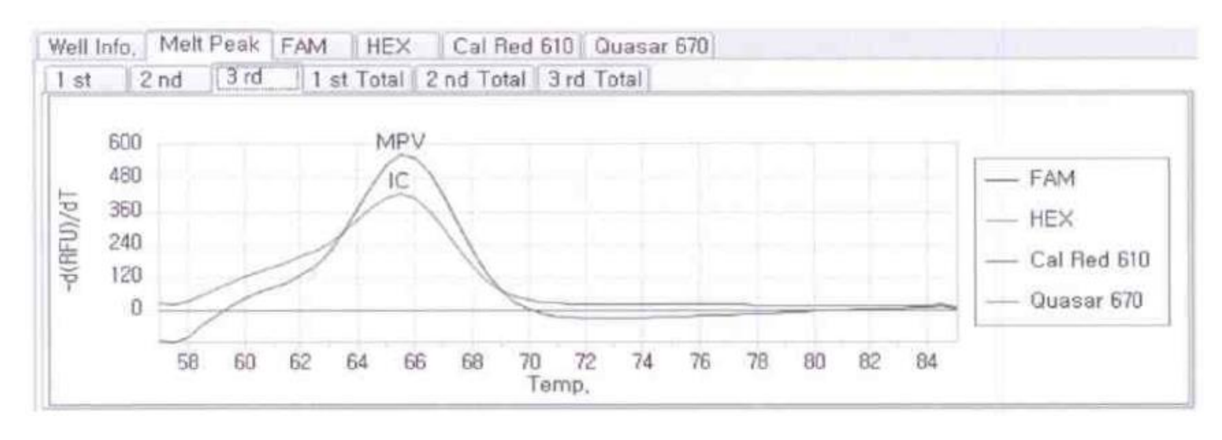


< Muestra 1 – Set B >

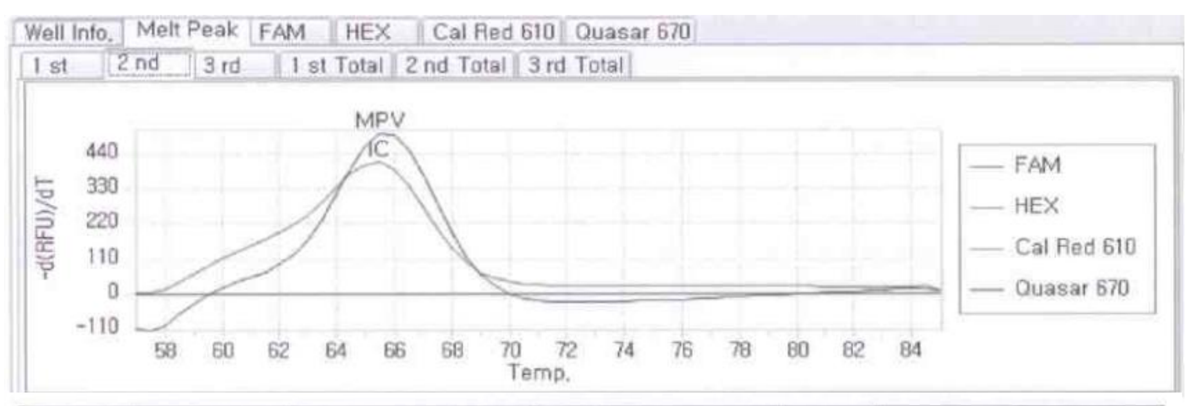
Pico de fusión- 1 (primer punto CMTA)



Pico de fusión- 2 (segundo punto CMTA)



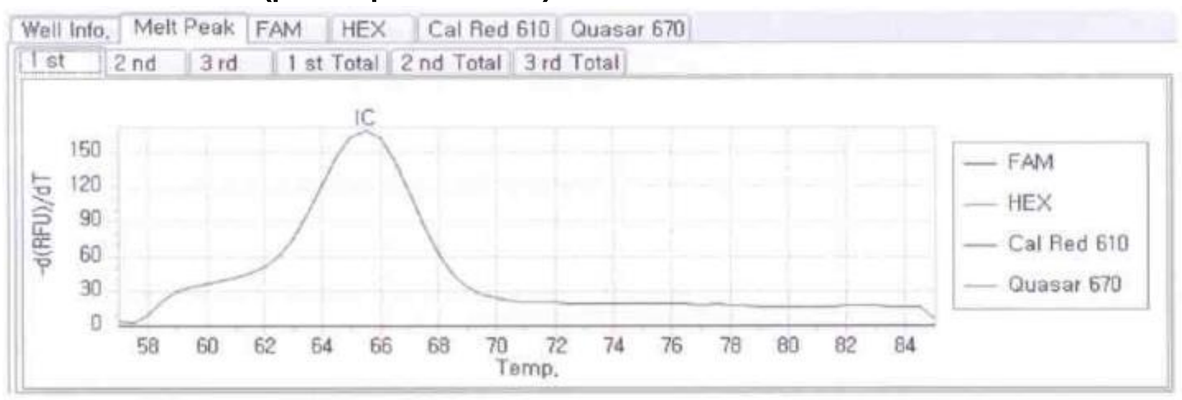
Pico de fusión- 3 (Tercer punto CMTA)



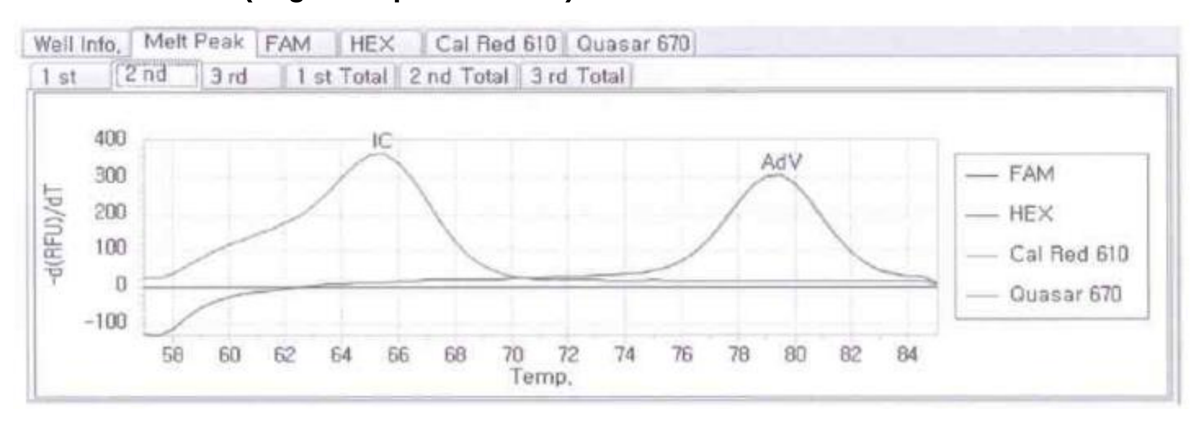
	FAM		HEX			Cal Red 610			Quasar 670	Auto interpretation
A set	PIV4	AdV	PIV1	PIV2	PIV3	FluA	FluB	HRV	IC	FluA
Sample 1	-	-	-	-	–	+++	-	-	+++	
B set	MPV	HBoV	229E	NL63	OC43	RSVA	RSVB	HEV	IC	MPV
Sample 1	+++	-	-	-	-	-	-	-	+++	

< Muestra 2 – Set A >

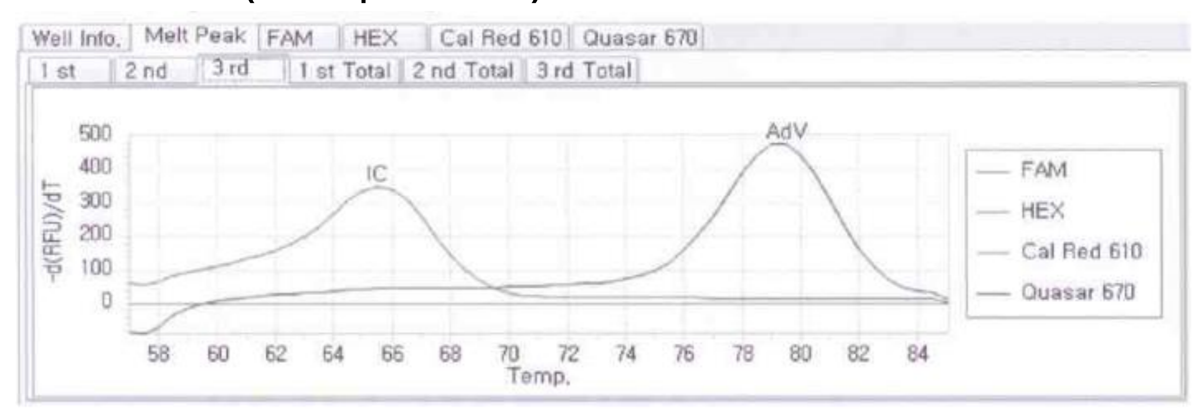
Pico de fusión- 1 (primer punto CMTA)



Pico de fusión- 2 (Segundo punto CMTA)

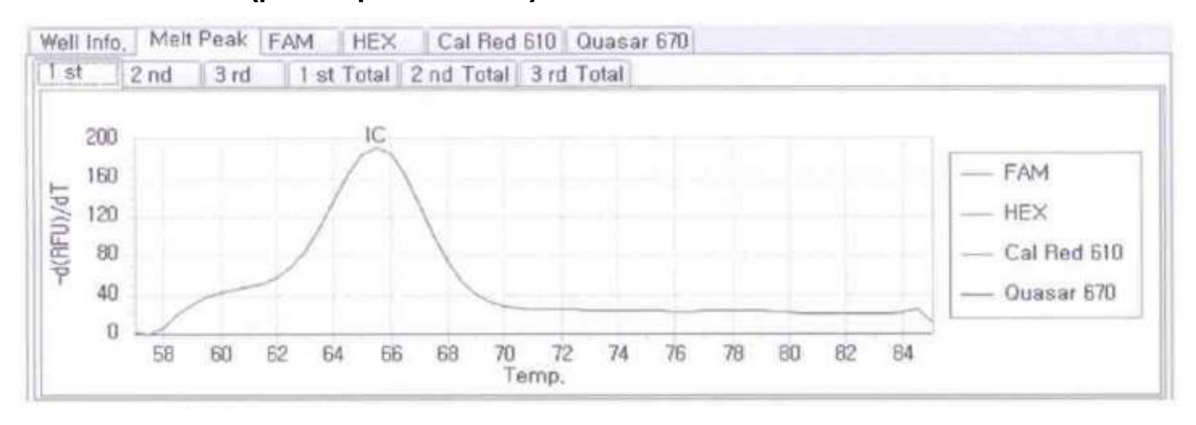


Pico de fusión- 3 (Tercer punto CMTA)

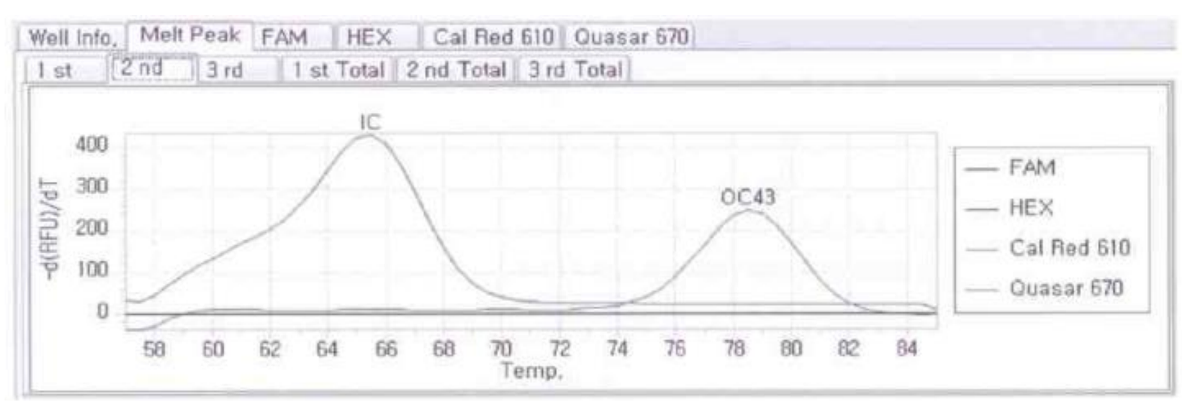


< Muestra 2 – Set B >

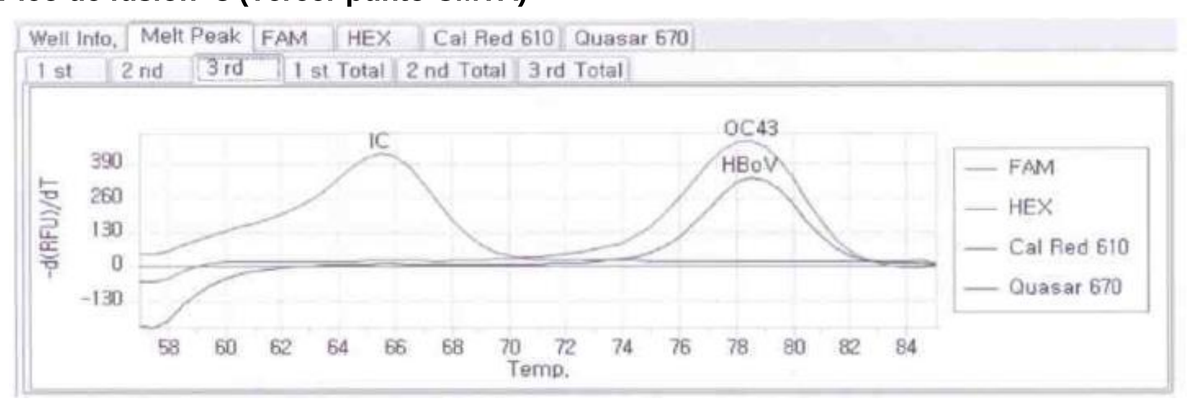
Pico de fusión- 1 (primer punto CMTA)



Pico de fusión- 2 (Segundo punto CMTA)



Pico de fusión- 3 (Tercer punto CMTA)



	FAM		HEX			Cal Red 610			Quasar 670	Auto interpretation
A set	PIV4	AdV	PIV1	PIV2	PIV3	FluA	FluB	HRV	IC	AdV
Sample 2	-	++	-	-	-	-	-	-	+++	
B set	MPV	HBoV	229E	NL63	OC43	RSVA	RSVB	HEV	IC	HBoV, OC43
Sample 2	-	+	-	-	++	-	-	-	+++	

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

ANYPLEX RV 16 DETECCION		
OBSERVACION	**CAUSA PROBABLE**	**SOLUCIÓN**
Control Interno a alguna otra señal no son observadas.	Los fluoroforo para análisis de datos no cumplen con el protocolo.	Seleccione los fluoróforos correctos para el análisis de datos.
	Temperatura de la máquina o ciclos de PCR incorrectos.	Verifique la condiciones de la PCR y repita la PCR bajos lo nuevos ajustes si es necesario.
	Se dejaron los reactivos por largo tiempo a temperatura ambiente o se almacenaron en condiciones no apropiadas.	Verifique las condiciones de almacenamiento, y fecha de vencimiento de los reactivos, repita el ensayo con kits nuevos si es necesario.
	Programación incorrecta	Repita el procedimiento de detección con una configuración correcta.
	Fallo en la extracción de ácidos nucleicos	Si el IC ha sido adicionado a la extracción, una ausencia de la señal de IC puede indicar la perdida de ácidos nucleicos durante la extracción asegúrese de usar un método de aislamiento recomendado. Re-extraiga la muestra original o de la muestra diluida con buffer salino por 1/10 y adicione RV16 IC a la muestra diluida.
La señal del control interno no es observada.	Alta carga del ácido nucleico del patógeno.	Si la señal del blanco es observada, es probable que sea positiva para el patógeno, aunque la señal del control interno no se observe. Si desea verificar el control interno, diluya la muestra en PBX (10-100X), y repita el paso de extracción con la muestra diluida.
	Presencia de inhibidores de PCR.	Diluya la muestra en Buffer salino (10X), y repita el paso de extracción. Si el resultado es inválido en uno de los dos panel repita el procedimiento usando los mismos métodos.
Falsos positivos o señal observada en el control positivo.	Presencia de contaminación cruzada.	Descontamine todas las superficies e instrumentos con hipoclorito de sodio y etanol. Use solo puntas con filtro durante el procedimiento de extracción. Cambie puntas entre tubos. Repita el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos con un nuevo set de reactivos.
	Contaminación cruzada entre PC1 y 2.	Reinicie el paso de extracción o de PCR en tiempo real.

OBSERVACIONES	CAUSAS DEL PROBLEMA	SOLUCIÓN
Se observan señales o falsos positivos en el Control Negativo.	Presencia de contaminación común	Descontamine todas las superficies y equipos con hipoclorito de sodio y etanol. Utilice solamente puntas con filtro durante el procedimiento de extracción. Cambie las puntas entre cada tubo. Repita la extracción de ácidos nucleicos con un nuevo *set* de reactivos.
	Contaminación cruzada entre PC1 y PC2	Reinicie el paso de extracción o la PCR en tiempo real.
No se observan señales o falsos negativos en el Control Positivo.	Error en la recolección de la muestra	Recolecte una nueva muestra
	Almacenamiento incorrecto de la muestra	Recolecte la muestra y repita todo el proceso. Asegúrese de que el producto se almacene según las condiciones recomendadas
	Error en la extracción de ácido nucléico	Re- extraiga el ácido nucléico
	Error en la adición de ácido nucléico a los tubos de PCR correspondientes	Verifique el número de muestras para los tubos que contienen ácido nucleico y asegúrese de adicionar el ácido nucleico en el tubo correcto durante el proceso de detección.
	Presencia de inhibidores de PCR.	Diluya la muestra en buffer salino (10X), y repita el paso de extracción con la muestra diluida.
	Los fluoróforos para el análisis de datos no cumplen con el protocolo.	Seleccione los fluoróforos correctos para el análisis de datos.
	Programación incorrecta.	Repita el procedimiento de detección con los ajustes adecuados.
	Mezclado de la PCR incorrecto.	Verifique si todos los componentes fueron o no adicionados. (Si usa el premix precompuesto, debe reducir la sensibilidad.) Cada reactivo usado para la homogenización y gire hacia abajo el tubo de reactivo después de la PCR de tiempo real.
	Los reactivos permanecieron a temperatura ambiente por un tiempo prolongado o se almacenaron en condiciones incorrectas.	Verifique las condiciones de almacenamiento y la fecha de caducidad (ver la etiqueta en el kit) de los reactivos, utilice un kit nuevo de ser necesario.

RENDIMIENTO

1. Especificidad

La alta especificidad del Anyplex II RV16 detection es asegurado por los primers específicos designados para los objetivos de interés y las condiciones de reacción. Anyplex II RV16 Detection ha sido evaluado para reacción cruzada con 81 patógenos diferentes: el resultado ilustra las amplificaciones de PCR en los únicos objetivos.

Organism	Strain No.	Result
Legionella pneumophila	ATCC 41782	-
Streptococcus pneumoniae	ATCC BAA-255D	-
Bordetella pertussis	ATCC BAA-589D	-
Haemophilus influenzae	ATCC 51907D	-
Mycoplasma pneumoniae	ATCC 29342	-
Chlamydophila pneumoniae	Korean isolate	-
Klebsiella pneumoniae	ATCC 700721D-5	-
Klebsiella oxytoca	ATCC 700324D	-
Serratia macrescens	ATCC 27137D-5	-
Enterobacter cloacae	KCTC 13047	-
Enterobacter aerogenes	ATCC 15038D	-
Proteus mirabilis	ATCC 12453D	-
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 47085D	-
Pseudomonas fluorescens	KCTC 49642	-
Candida albicans	ATCC 14053	-
Staphylococcus aureus	ATCC 700699D-5	-
Streptococcus mitis	ATCC 3556	-
Streptococcus agalactiae	ATCC BAA-611D	-
Fusobacterium nucleatum	ATCC 25586D-5	-
Human herpesvirus 1	ATCC VR-260	-
Human herpesvirus 2	ATCC VR-734	-
Human influenza A virus (H3N2)	ATCC VR-544	+ (FluA)
Human influenza A virus (H3N2)	ATCC VR-547	+ (FluA)
Human influenza A virus (H3N2)	ATCC VR-822	+ (FluA)

2. **Sensibilidad**

Para determinar la sensibilidad del Anyplex II RV16 se hicieron diluciones seriadas estándar de 10^5 a 10^{-1} copias de ADN plasmÍdico por reacción, y se analizaron con el kit Anyplex II RV16. El límite de detección es de 50 copias por reacción.

3. **Reproducibilidad:**

Las pruebas de reproducibilidad fueron realizadas en tres diferentes tiempos, en el transcurso de 10 días, por tres diferentes experimentadores. Los mismos resultados fueron obtenidos en cada prueba, confirmando la reproducibilidad del producto.

REFERENCIAS

1. Jong-Yoon Chun, Kyoung-Joong Kim, In-Taek Hwang, Yun-Jee Kim, Dae-Hoon Lee, In-Kyoung Lee, and Jong-Kee Kim (2007) Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Research* **35**: e 40
2. S. Bellau-Pujol, A. Vabret, L. Legrand, J. Dina, S. Gouarin, J. Petitjean-Lecherbonnier, B. Pozzetto, C. Ginevra, and F. Freymuth (2005) Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *Journal of Virological Methods* **126**: 53-63.
3. M. T. Coiras, P. Perez-Brena, M. L. Garcia, I. Casas (2003) Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *Journal of Medical Virology* **69**:132-144
4. M. T. Coiras, J. C. Aguilar, M. L. Garcia, I. Casas, and P. Perez-Brena (2004) Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *Journal of Medical Virology* **72**: 484-495
5. A. Purkayastha, S. E. Ditty, J. Su, J. Mcgraw, T. L. Handfield, C. Tibbetts, and D. Seto (2005) Genomic and bioinformatics analysis of HAdV-4, a human adenovirus causing acute respiratory disease: implication for gene therapy and vaccine vector development. *Journal of Virology* **79**: 2559-2572.
6. M. W. Syrmis, D. M. Whiley, M. Thomas, I. M. Mackay, J. Williamson, D. J. Siebert, M. D. Nissen, and T. P. Sloots (2004) A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *Journal of Diagnostics* **6**: 15-131.
7. Y. Jinno, K. Yoshiura, and N. Niikawa (1990) Use of psoralen as extinguisher of contaminated DNA in PCR. *Nucleic Acids Research* **18**: 6739.
8. C. E. Corless, M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, E. B. Kaczmarski, and A. J. Fox (2000) Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 1747-1752.
9. S. Gottlieb (2004) Metapneumovirus is a leading cause of respiratory tract infection in

infants. *BMJ* **328**:7434.

10. M. Hindiyeh, V. Levy, R. Azar, N. Varsano, L. Regev, Y. Shalev, Z.Grossman, and E. Mendelson (2005) Evaluation of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for

detection and differentiation of influenza viruses A and B during the 2001-2002 influenza season in Israel. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 589-595.

11. A. J. Easton, J. B. Domachowske, and H. F. Rosenberg (2004) Animal Pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* **17**: 390-412.
12. Medimmune progress development of respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type-3 vaccines. *Pharmaceutical News*, Oct 13, 2004.
13. Respiratory syncytial virus. Microbiology and Bacteriology, Aug 6, 2000
14. http://www.cbsnews.com/stories/2003/09/16/heat/main573644.shtml
15. http://www.astdhpphe.org/infect/rsv.html
16. http://www.answers.com/topic/common-cold
17. http://www.wikipedia.org

SIMBOLOGÍA

Explicación de los símbolos utilizados en las etiquetas.

Símbolo	Explicación
IVD	Para Diagnóstico in vitro
LOT	Número de Lote
REF	Número de catálogo
	Fecha de vencimiento
	Temperatura de Almacenamiento
	Precaución
PRIMER	Mezcla de oligonucleotidos para amplificación y detección
WATER	Agua libre de Rnasas
CONTROL +	Control Positivo
CONTROL IC	Control Interno
PREMIX	Mezcla Maestra para PCR Anyplex
	Fabricante
	Fecha de fabricación
i	Consulte instrucciones de uso

INFORMACIÓN DE PEDIDO